

Wprowadzenie

Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR, ang. *antimicrobial resistance*), która występuje zarówno w środowisku klinicznym, jak i naturalnym, stanowi przedmiot wielu prac badawczych, jednak dotychczas zagadnieniem narastającej antybiotykooporności zajmowano się głównie z perspektywy medycyny i weterynarii.

Według Światowej Organizacji Zdrowia rozwiązanie problemu AMR wymaga holistycznego podejścia, tzw. „One Health”, które wskazuje na powiązanie i wzajemne oddziaływanie na siebie trzech sfer: ludzkiej, weterynaryjnej i środowiskowej. Jest to istotne w kontekście zwiększonej urbanizacji oraz intensywnej chemizacji rolnictwa, które prowadzą do zanieczyszczenia i degradacji środowiska.

Gleby stanowią środowisko dla najbogatszych biocenoz na Ziemi i są kluczowe w produkcji żywności. Antybiotykooporne bakterie (ARB, ang. *antibiotic resistant bacteria*) oraz geny oporności na antybiotyki (ARG, ang. *antibiotic resistance genes*) przedostają się do gruntów m.in. wraz z odchodami zwierząt. Mogą one później zostać przeniesione z powrotem na ludzi i zwierzęta przez bakterie patogenne a w trakcie całego procesu istnieje prawdopodobieństwo ewolucji ARB oraz nabycia przez nie nowych mechanizmów oporności poprzez horizontalny transfer genów.

Wiedza na temat dalszych losów ARB i ARG uwolnionych do środowiska oraz ich interakcji z mikroorganizmami autochtonicznymi jest wciąż niepełna. Pewne jest, że warunki środowiskowe i właściwości ekologiczne mogą wpływać na funkcjonowanie ARB i ARG w środowisku. Według postawionej hipotezy wysoka naturalna różnorodność biologiczna ekosystemów ma posiadać kluczowe znaczenie dla ograniczania rozprzestrzeniania się AMR w środowisku. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki wstępnej analizy mikrobiologicznej różnorodności wybranych gleb leśnych i ornych w Polsce. Na podstawie tych rezultatów środowiska o różnych poziomach bioróżnorodności zostaną wytypowane do dalszych eksperymentów dotyczących relacji pomiędzy bioróżnorodnością a rozpowszechnianiem się AMR w środowisku.

Cel pracy

Analiza mikrobiologicznej różnorodności badanych ekosystemów glebowych charakteryzujących się różnym poziomem presji antropogenicznej.

Metody

Próbki gleb leśnych i ornych pobrano z wybranych lokalizacji i podzielono na 3 kategorie: próby pobrane z gleb, na których nie był wywierany wpływ antropogeniczny („Control”; lasy n=2), próby pochodzące z gleb, gdzie ten wpływ był niski („Low”; pola nienawożone n=2, gleby organiczne n=3) oraz próby, gdzie ten wpływ był wysoki („High”; pola nawożone n=2).

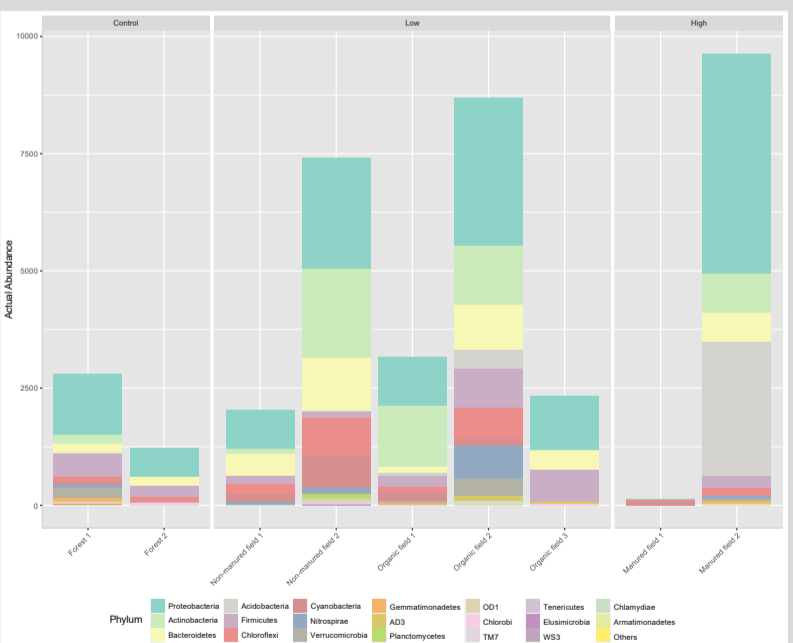
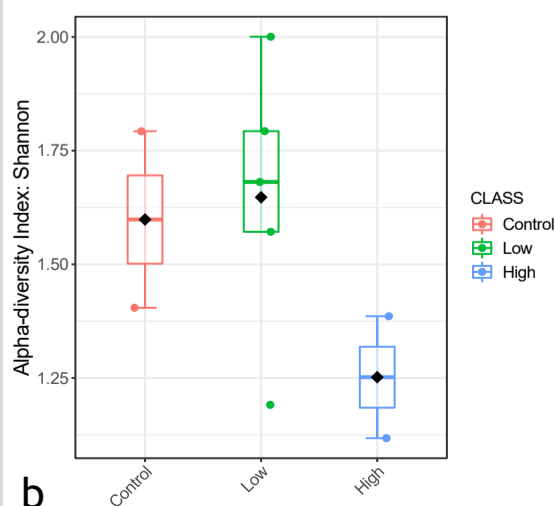
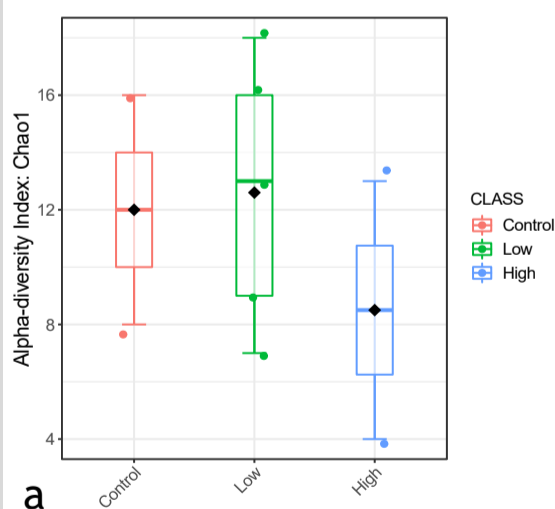
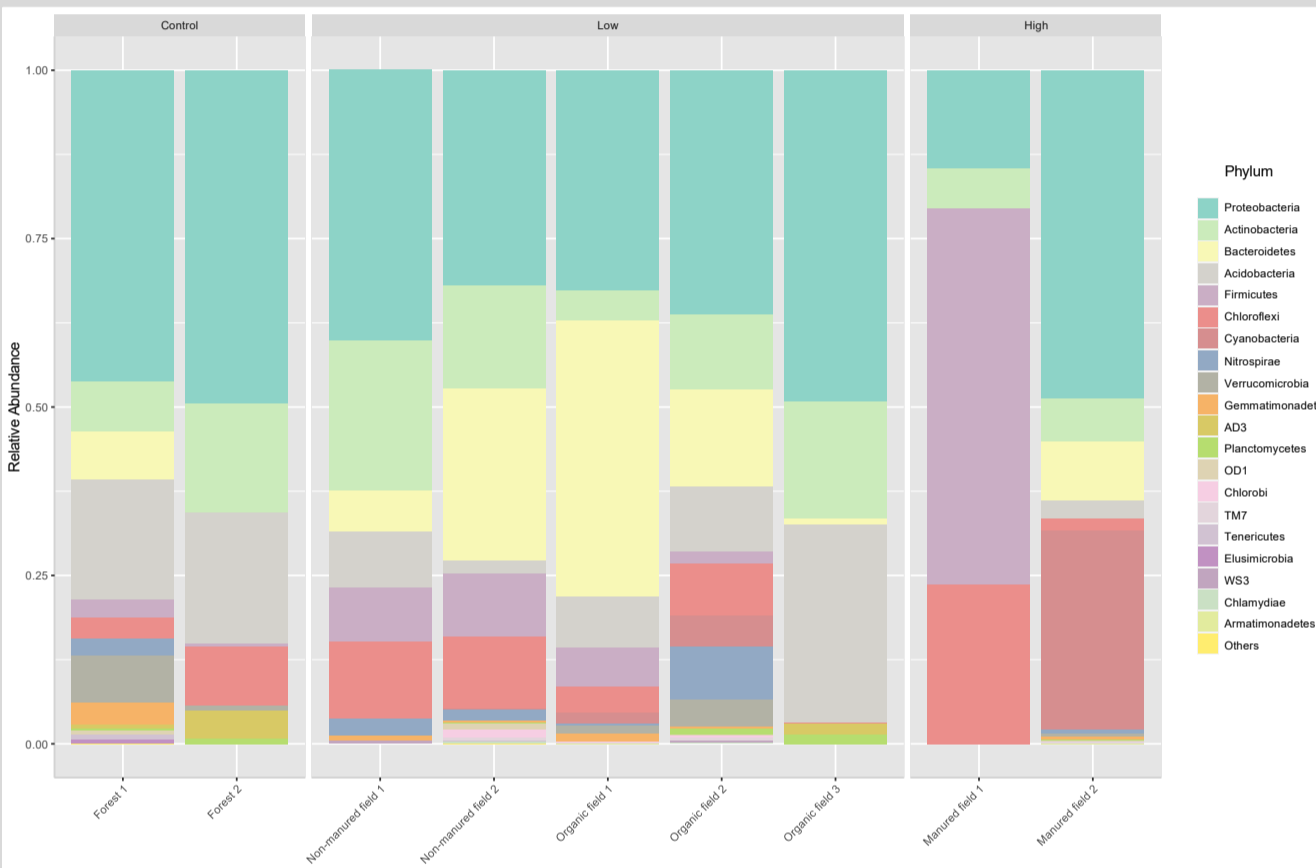
DNA wyizolowano z wykorzystaniem zestawu Dneasy PowerSoil Pro i poddano sekwencjonowaniu region zmienny V3-V4 genu dla 16S rRNA na platformie Illumina MiSeq. Uzyskane dane sekwencjonowania zostały przeanalizowane w programie Qiime2 z wykorzystaniem narzędzia DADA2 do kontroli jakości sekwencji oraz bazy danych genów 16S rRNA Greengenes w celu klasyfikacji taksonomicznej. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej: indeks Chao1 i Shannon oraz PCoA (principal coordinates analysis), a także wizualizacji z wykorzystaniem MicrobiomeAnalyst.

Wyniki i wnioski

Skład mikrobiomu badanych gleb jest zróżnicowany, a wewnątrz badanych grup zaobserwowano duże rozbieżności dla poszczególnych prób, zwłaszcza w przypadku gleb o wysokiej presji antropogenicznej. W glebach kontrolnych dominowały typy *Proteobacteria* (46-49%) i *Acidobacteria* (18-19%). W glebach z grupy o niskim wpływie antropogenicznym najpowszechniej występowały bakterie typów *Proteobacteria* (30-48%), *Bacteroidetes* (1-41%) i *Actinobacteria* (4-22%). W glebach o wysokim wpływie obecne były głównie bakterie typów *Proteobacteria* (14-45%) i *Firmicutes* (0-56%) (Rys.1 i 2).

Przeprowadzone analizy statystyczne nie pozwalają na stwierdzenie występowania różnic w bioróżnorodności pomiędzy badanymi próbkami w zależności od występowania presji antropogenicznej. Mikrobiomy gleb o zbliżonym poziomie presji antropogenicznej cechują się różnymi poziomami bioróżnorodności. Analiza z wykorzystaniem indeksów Chao1 (p-value=0,5794, Kruskal-Wallis) i Shannon (p-value=0,20874, Kruskal-Wallis) oraz PCoA (p-value<0,095; ANOSIM, Bray-Curtis) nie wykazała różnic na poziomie typów bakterii pomiędzy zróżnicowaniem mikrobiologicznym badanych społeczności (Rys. 3). W celu uwidocznienia potencjalnej relacji pomiędzy presją antropogeniczną a bioróżnorodnością potrzebne są dalsze badania, uwzględniające większą pulę badanych gleb o zbliżonych właściwościach, poddanych różnym poziomom presji antropogenicznej, oraz szerszy kontekst obejmujący wpływ innych czynników, jak rodzaj gleby, czy właściwości fizykochemiczne, na bioróżnorodność. W tym aspekcie istotne są również wymagania pokarmowe danych rodzajów bakterii, w tym patogennych.

Gleby leśne i orne o różnych poziomach bioróżnorodności będą wybrane do dalszych badań dotyczących wpływu różnorodności biologicznej na rozpowszechnianie się AMR w środowisku. Zakładają one dalszy monitoring bioróżnorodności, analizy rezystomu środowisk oraz eksperymenty w mikrokosmosach, w ramach których badana będzie przeżywalność dodawanych do gleb ARB oraz transfer przenoszonych przez nie ARG.



Informacje o projekcie

Badania są prowadzone w ramach projektu międzynarodowego pt. „ANTIVERSA - Bioróżnorodność jako ekologiczna bariera dla rozprzestrzeniania się istotnej klinicznie oporności na antybiotyki w środowisku” (BiodivERSA Call 2018, Kierownik Projektu – dr hab. Magdalena Popowska, prof. ucz., nr Umowy NCN: UMO-2019/32/Z/NZ8/00011).

Rys. 3. Różnorodność alfa – indeks Chao1 dla badanych środowisk z podziałem na grupy o różnym wpływie antropogenicznym (a) (p-value=0,5794, Kruskal-Wallis); wskaźnik różnorodności Shannona dla badanych prób z podziałem na grupy o różnym wpływie antropogenicznym (b) (p-value=0,20874, Kruskal-Wallis); mapa lokalizacji miejsc poboru prób (c); zdjęcia poglądowe miejsc poboru (d)